

Rec'd PCT/PTO 08 JUL 2004

10/500911

日 本 国 特 許  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/00111

REC'D 07 MAR 2003

WIPO

09.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 1月10日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-003769

[ST.10/C]:

[JP2002-003769]

出 願 人

Applicant(s):

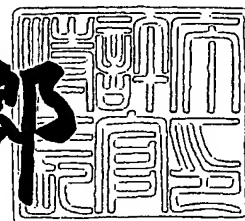
武田薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月18日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3008075

【書類名】 特許願

【整理番号】 B01463

【提出日】 平成14年 1月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市中山寺3丁目8番7号

    【氏名】 野田 昌邦

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府池田市緑丘1丁目3番21号

    【氏名】 松尾 孝徳

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県西宮市大屋町17番10-708号

    【氏名】 柘植 裕子

【特許出願人】

    【識別番号】 000002934

    【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100114041

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高橋 秀一

【選任した代理人】

    【識別番号】 100110456

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005142

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。

【請求項 3】 タンパク質が配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】 疾患が腎疾患である請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】 腎疾患が E g r -1 依存性腎疾患である請求項 4 記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】 腎疾患が糖尿病性腎症である請求項 4 記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の生産量を比較することを特徴とする、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその

塩の活性を比較することを特徴とする、請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項1記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩。

【請求項10】 請求項1記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

【請求項11】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。

【請求項12】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法。

【請求項13】 ポリヌクレオチドが配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を有する請求項11記載のスクリーニング方法。

【請求項14】 疾患が腎疾患である請求項11記載のスクリーニング方法。

【請求項15】 腎疾患がE g r-1依存性腎疾患である請求項14記載のスクリーニング方法。

【請求項16】 腎疾患が糖尿病性腎症である請求項14記載のスクリーニング方法。

【請求項17】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号：1で表されるアミノ

酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするポリヌクレオチドの量を比較することを特徴とする、請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項18】請求項11記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩。

【請求項19】請求項11記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

【請求項20】配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する抗体。

【請求項21】請求項20記載の抗体を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

【請求項22】配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬。

【請求項23】疾患が腎疾患である請求項22記載の予防・治療薬。

【請求項24】腎疾患がEgfr-1依存性腎疾患である請求項23記載の予防・治療薬。

【請求項25】腎疾患が糖尿病性腎症である請求項23記載の予防・治療薬。

【請求項26】Egfr-1抑制薬を含有してなる糖尿病性腎症の予防・治療薬。

【請求項27】Egfr-1抑制薬が腎Egfr-1抑制薬である請求項26記載の予防・治療薬。

【請求項28】哺乳動物にEgfr-1抑制薬を投与することを特徴とする、該哺乳動物における糖尿病性腎症の予防または治療方法。

【請求項29】Egfr-1抑制薬が腎Egfr-1抑制薬である請求項28記載の方法。

【請求項30】糖尿病性腎症の予防・治療薬を製造するための、E g r-1抑制薬の使用。

【請求項31】E g r-1抑制薬が腎E g r-1抑制薬である請求項30記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腎疾患などの予防・治療薬をスクリーニングするための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、Early Growth Response-1（本明細書中、E g r-1と略記することがある）が知られている。

E g r-1は、虚血により活性化され、炎症、凝固および血管透過性の重要なレギュレーターの発現を誘導する転写因子である（Nature Medicine, vol.6, No.12, p.1355）。

これまでに、E g r-1を用いて、E g r-1に関連する疾患の予防・治療薬をスクリーニングする方法についての報告は見当たっていない。

なお、現在、腎疾患の治療薬としては、アンジオテンシン変換酵素阻害剤などが用いられているが、本薬剤は、腎血行動態に影響を及ぼすために、高度の腎機能低下患者に用いることはできない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

優れた効果を有し、かつ、副作用のない腎疾患などの予防・治療薬、およびこのような予防・治療薬をスクリーニングすることの可能な方法が求められている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、腎疾患モデル動物において腎 E g r -1 の発現が顕著に増加していることを初めて見出し、さらに、腎疾患モデル動物における腎 E g r -1 の発現を抑制することによって、腎疾患の治療効果が得られることを初めて見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

- 1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法；
- 2) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法；
- 3) タンパク質が配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する前記1)記載のスクリーニング方法；
- 4) 疾患が腎疾患である前記1)記載のスクリーニング方法；
- 5) 腎疾患が E g r -1 依存性腎疾患である前記4)記載のスクリーニング方法；
- 6) 腎疾患が糖尿病性腎症である前記4)記載のスクリーニング方法；
- 7) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の生産量を比較することを特徴とする、前記1)記載のスクリーニング方法；
- 8) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミ



ノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の活性を比較することを特徴とする、前記1)記載のスクリーニング方法；

9) 前記1)記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩；

10) 前記1)記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；

11) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法；

12) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法；

13) ポリヌクレオチドが配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を有する前記11)記載のスクリーニング方法；

14) 疾患が腎疾患である前記11)記載のスクリーニング方法；

15) 腎疾患がEgfr-1依存性腎疾患である前記14)記載のスクリーニング方法；

16) 腎疾患が糖尿病性腎症である前記14)記載のスクリーニング方法；

17) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合との、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と

同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするポリヌクレオチドの量を比較することを特徴とする、前記 11) 記載のスクリーニング方法；

18) 前記 11) 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩；

19) 前記 11) 記載のスクリーニング方法によって得られた化合物またはその塩を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；

20) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する抗体；

21) 前記 20) 記載の抗体を含有してなる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；

22) 配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療薬；

23) 疾患が腎疾患である前記 22) 記載の予防・治療薬；

24) 腎疾患が E g r -1依存性腎疾患である前記 23) 記載の予防・治療薬；

25) 腎疾患が糖尿病性腎症である前記 23) 記載の予防・治療薬；

26) E g r -1抑制薬を含有してなる糖尿病性腎症の予防・治療薬；

27) E g r -1抑制薬が腎 E g r -1抑制薬である前記 26) 記載の予防・治療薬；

28) 哺乳動物に E g r -1抑制薬を投与することを特徴とする、該哺乳動物における糖尿病性腎症の予防または治療方法；

29) E g r -1抑制薬が腎 E g r -1抑制薬である前記 28) 記載の方法；

30) 糖尿病性腎症の予防・治療薬を製造するための、E g r -1抑制薬の使用；

31) Egr-1抑制薬が腎Egr-1抑制薬である前記30)記載の使用；などに関する。

#### 【0006】

本発明において、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と略記することがある）は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってよく、合成タンパク質であってもよい。

#### 【0007】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、最も好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

## 【0008】

実質的に同質の活性としては、例えば、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、および血栓関連遺伝子の転写制御活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、転写制御活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

線維化関連遺伝子としては、例えば、platelet-derived growth factor-A chain (PDGF-A chain)、platelet-derived growth factor-B chain (PDGF-B chain)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、tumor growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、vascular endothelial cell growth factor (VEGF)、PDGF  $\beta$  receptor (PDGF  $\beta$  R)、insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1 R)、fibronectin、 $\alpha$ 2 (1) collagenなどが挙げられる。細胞周期関連遺伝子としては、例えばp53などが挙げられる。血栓関連遺伝子としては、例えば、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、tissue factor (TF)、metalloproteinaseなどが挙げられる。

転写制御活性の測定は、公知の方法、例えばShi-Fang Yanらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻、8298-8303頁、1998年) またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

## 【0009】

また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程

度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、  
 ④配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は特に限定されない。

本発明のタンパク質は、好ましくは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質、すなわちE g r -1である。

### 【0010】

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基；例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基； $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミ

ノ酸の側鎖上の置換基（例えば－OH、－SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

#### 【0011】

本発明のタンパク質の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質またはその塩は、前述した哺乳動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。具体的には、哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズし、可溶画分を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーで分離精製することによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。

#### 【0012】

本発明のタンパク質またはその塩は、公知のペプチド合成法にしたがって製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするタンパク質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の①～⑤に記載された方法にしたがって行われる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuecke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

このようにして得られたタンパク質は、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

上記方法で得られるタンパク質が遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にタンパク質が塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

### 【0013】

本発明のタンパク質またはその塩は、通常、市販のタンパク質合成用樹脂を用いて合成される。このような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などが挙げられる。

このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を行って、目的のタンパク質を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合においては、タンパク質合成に使用できる各種活

性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類が好ましい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。

保護アミノ酸の縮合は、例えば活性化試薬およびラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、あらかじめ保護アミノ酸を対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとして活性化した後に樹脂に添加することによって行われる。

#### 【0014】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒は、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択される。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類；塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類；トリフルオロエタノールなどのアルコール類；ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類；ピリジンなどのアミン類；ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類；アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類；酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類；あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。

反応温度は、タンパク質縮合反応に使用されることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は、通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には、保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。縮合反応を繰り返しても縮合が不十分な場合には、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、十分な縮合を行なうことができる。

#### 【0015】

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオ



キシカルボニル、 $C_{1-Z}$ 、 $Br-Z$ 、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。

原料アミノ酸のカルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。エステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ $C_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などが挙げられる。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、 $Bzl$ 、 $C_{12}-Bzl$ 、2-ニトロベンジル、 $Br-Z$ 、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 $Tos$ 、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、 $Bum$ 、 $Boc$ 、 $Trt$ 、Fmocなどが用いられる。

#### 【0016】

原料アミノ酸のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料アミノ酸のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリ

ン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元；無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理；ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理；液体アンモニア中ナトリウムによる還元などが挙げられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれる。酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基は、チオフェノール処理により除去される。トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は、1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

#### 【0017】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護方法ならびに保護基、およびその保護基の脱離方法、反応に関与する官能基の活性化方法などは、公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体は、公知の方法にしたがい、該タンパク質のカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化することによって製造することができる。

タンパク質のエステル体は、例えば、該タンパク質のカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合することによって製造することができる。

#### 【0018】

さらに、本発明のタンパク質またはその塩は、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養し、得られる培養物から本発明のタンパク

質またはその塩を分離精製することによって製造することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAなどが挙げられる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAなどが挙げられる。

配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60

～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が好ましい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列（好ましくは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列）を含有するタンパク質をコードするDNAは、好ましくは配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNAなどである。

#### 【0019】

本発明のタンパク質を完全にコードするDNAは、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

#### 【0020】

前記した発現ベクターは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプ

ロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）；枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）；酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）； $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス；pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

#### 【0021】

発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐

性遺伝子（以下、 $Neor^r$ と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが；宿主がバチルス属菌である場合、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが；宿主が酵母である場合、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

#### 【0022】

本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体は、公知の方法にしたがい、該DNAを含有する発現ベクターで、宿主を形質転換することによって製造することができる。

ここで、発現ベクターとしては、前記したものが挙げられる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナ

ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95 巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

#### 【0023】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の MG1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five<sup>TM</sup> 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞、*Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが BmNPV の場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; BmN 細胞) などが用いられる。該 Sf 細胞としては、例えば、Sf9 細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21 細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature) , 315 巻, 592 (1985)] 。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO 細胞と略記)、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記)、マウス L 細胞、マウス AtT-20, マウスミエロマ細胞、ラット GH3, ヒト FL 細胞などが用いられる。

#### 【0024】

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法にしたがって実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69 巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17 巻, 107

(1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って形質転換することができる。

#### 【0025】

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法にしたがって実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～8である。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル



・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約 $15\sim 43^{\circ}\text{C}$ で、約 $3\sim 24$ 時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で、約 $6\sim 24$ 時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や $0.5\%$ カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約 $5\sim 8$ である。培養は、通常約 $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ で、約 $24\sim 72$ 時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した $10\%$ ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約 $6.2\sim 6.4$ である。培養は、通常約 $27^{\circ}\text{C}$ で、約 $3\sim 5$ 日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約 $5\sim 20\%$ の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association)]

ciation) 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。培地の pH は、好ましくは約 6~8 である。培養は、通常約 30℃~40℃ で、約 15~60 時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を製造することができる。

#### 【0026】

前記形質転換体を培養して得られる培養物から本発明のタンパク質を自体公知の方法にしたがって分離精製することができる。

例えば、本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤を含んでいてもよい。培養物中にタンパク質が分泌される場合には、培養物から、公知の方法で培養上清を集める方法が用いられる。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の方法にしたがって分離精製することができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

#### 【0027】

かくして得られるタンパク質が遊離体として得られた場合には、自体公知の方

法あるいはそれに準じる方法によって、該遊離体を塩に変換することができ、タンパク質が塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、形質転換体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして得られる本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明のタンパク質が関連する疾患としては、正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が増加あるいは減少している疾患が挙げられる。

ここで、「正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が増加している疾患」としては、例えば腎疾患（例えば、糖尿病性腎症；慢性糸球体腎炎；IgA腎症；腎移植後の慢性拒絶；腎癌；腹膜透析時の腹膜硬化症）；循環器疾患（例えば、動脈硬化症；心筋梗塞；心不全；心筋症；PTCAおよびステント留置後の血管再狭窄；心・血管移植後の慢性拒絶；血栓症）；脳血管障害（例えば、脳梗塞）；肺疾患（例えば、肺線維症、慢性閉塞性肺症候群、肺癌）；肝疾患（例えば、肝硬変、肝炎、肝癌）；消化管疾患（例えば、大腸炎、胃癌、大腸癌）；性腺疾患（例えば、前立腺癌）；膠原病（例えば、強皮症、全身性エリテマトーデス）；リウマチ性疾患（例えば、慢性関節リウマチ）；骨疾患（例えば、骨粗鬆症）などが挙げられる。

「正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が減少している疾患」としては、例えば消化管疾患（例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の治癒）；皮膚疾患（例えば、火傷、術後の創傷）などが挙げられる。

本発明のタンパク質が関連する疾患としては、「正常時と比較した場合に、本発明のタンパク質の量が増加している疾患」が好ましい。

また、本発明のタンパク質が関連する疾患としては、生体内における E g r -

1の量に依存して発症する、E g r -1依存性疾患が好ましい。

本発明のタンパク質が関連する疾患は、好ましくは腎疾患であり、さらに好ましくはE g r -1依存性腎疾患である。とりわけ、腎E g r -1依存性腎疾患が好ましい。

【0029】

本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする、該タンパク質が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法に関する。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、

- 1) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合とで、本発明のタンパク質の生産量を比較すること；
- 2) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合とで、本発明のタンパク質の活性を比較すること；
- 3) 試験化合物が共存する場合と共存しない場合とで、本発明のタンパク質の活性を比較すること；などによって行われる。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞は、該タンパク質を産生する能力を有する細胞である限り特に限定されないが、酸化ストレスや増殖因子処理などの各種刺激に応じて本発明のタンパク質（好ましくはEgr-1）の産生が誘導されるものが好ましい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞は、前記した「本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体」であってもよい。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の好適な例としては、哺乳動物（好ましくは、ヒト、ラット、マウスなど）の腎臓から単離された細胞などが挙げられる。これらの細胞は不死化されたものであってもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の培養は、前記した形質転換体と同様にして行われる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げら

れる。

本発明のタンパク質は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体を用いて、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従って定量することができる。

#### 【0030】

本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を認識し得る抗体であれば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の何れであってもよい。また、該抗体は、抗体分子そのものであってもよいし、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分であってもよい。また、抗体は標識されていてもよい。

抗体の標識に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

#### 【0031】

本発明のタンパク質を定量する際、定量されるタンパク質は、細胞内に含まれるものまたは細胞外に分泌されたもののいずれであってもよく、さらに両者の合計であってもよい。

また、細胞内に含まれる本発明のタンパク質を定量する場合、細胞を適当な固定液あるいは膜透過促進剤処理した後に行うことが好ましい。また、細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波または凍結融解などによって細胞を破壊した後、破碎液中のタンパク質を定量することもできる。必要により、破碎液中のタンパク質を分離精製した後に、タンパク質の定量を行ってもよい。

## 【0032】

本発明のスクリーニング方法において用いられる本発明のタンパク質の活性としては、例えば転写制御活性などが挙げられる。具体的には、例えば「本発明のタンパク質が結合し得るポリヌクレオチドに対する結合活性」、「本発明のタンパク質による転写制御の支配下にある遺伝子の発現制御活性」などが挙げられる。

該ポリヌクレオチドとしては、例えば、後述の配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチド（好ましくは、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチド）が挙げられる。

上記結合活性は、公知の方法、例えばShi-Fang Yanらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻、8298-8303頁、1998年）またはそれに準じる方法に従ってゲルシフトアッセイ法（electrophoretic mobility shift assay）を用いて測定することができる。

「本発明のタンパク質による転写制御の支配下にある遺伝子」としては、前記「実質的に同質の活性」として例示した線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子および血栓関連遺伝子が挙げられる。

これらの遺伝子の発現制御活性は、実施例に記載の方法に準じて、該遺伝子をコードするDNA配列から適当なプライマーを作成し、RT-PCRを行って該遺伝子の転写産物量を測定することにより測定できる。また、上記発現制御活性は、公知の方法、例えばShi-Fang Yanらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻、8298-8303頁、1998年）またはそれに準じる方法に従って、該遺伝子をコードするDNAの塩基配列を含むポリヌクレオチドを標識して作成したプローブを用いたノザンブロッティング法により測定できる。また、上記発現制御活性は、公知の方法、例えばShi-Fang Yanらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻、8298-8303頁、1998年）またはそれに準じる方法に従って、「本発明のタンパク質による転写制御の支配下にある遺伝子」をコードするDNA上において配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を含む転写調節領域と適当なレポーター遺伝子を連結したベクターを作成し、該ベクターを適当な細胞に導入して、レポーター

遺伝子がコードするタンパク質の発現を確認することによっても測定できる。

【0033】

上記スクリーニング方法によって、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質、すなわち、本発明のタンパク質の産生を調節（促進または阻害）させる化合物、あるいは本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害）する化合物をスクリーニングすることができる。

例えば、本発明のタンパク質の量を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上増大させる試験化合物を、本発明のタンパク質の産生を促進する化合物として；本発明のタンパク質の量を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少させる試験化合物を本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物として、それぞれ選択することができる。

例えば、本発明のタンパク質の活性を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上増大させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物として；本発明のタンパク質の活性を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少させる試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として、それぞれ選択することができる。

また、本発明のタンパク質を定量することによって、被検体中における該タンパク質の量の増加または減少が確認された場合、被検体为本発明のタンパク質が関連する疾患に罹患しているか、または被検体が該疾患に罹患する可能性が高いと診断することができる。

さらに、本発明のタンパク質の活性を測定することによって、被検体中における該タンパク質の活性の増大または減少が確認された場合、被検体为本発明のタンパク質が関連する疾患に罹患しているか、または被検体が該疾患に罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などのいずれであってもよい。これらは塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられる。

## 【0034】

本発明のタンパク質に対する抗体は、該タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。

## 〔モノクローナル抗体の作製〕

## (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質を、哺乳動物に対して、投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

例えば、抗原で免疫された哺乳動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は、既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

## 【0035】

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの哺乳動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は、1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000



）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法；抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法；などによりスクリーニングすることができる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。モノクローナル抗体の選別は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。モノクローナル抗体の選別および育種用培地は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。このような培地としては、例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って

分離精製することができる。

【 0 0 3 6 】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、自体公知の方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0. 1 ～ 2 0、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプリングさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤、例えばグルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 1 0 回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【 0 0 3 7 】

本発明のスクリーニング方法により得られる「本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質」（化合物）は、必要により薬理学的に許容し得る担体とともに混合して医薬組成物とした後に、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として用いることができる。

ここで、薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

#### 【0038】

賦形剤の好適な例としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、デンプン、 $\alpha$ 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、デキストリン、プルラン、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどが挙げられる。

滑沢剤の好適な例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

結合剤の好適な例としては、 $\alpha$ 化デンプン、ショ糖、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、トレハロース、デキストリン、プルラン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、乳糖、白糖、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、軽質無水ケイ酸、低置換度ヒドロキシプロピルセルロースなどが挙げられる。

溶剤の好適な例としては、注射用水、生理的食塩水、リンゲル液、アルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子；ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙げられる。

等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖などが挙げられる。

緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

着色剤の好適な例としては、水溶性食用タール色素（例、食用赤色2号および3号、食用黄色4号および5号、食用青色1号および2号などの食用色素、水不溶性レーキ色素（例、前記水溶性食用タール色素のアルミニウム塩など）、天然色素（例、β-カロチン、クロロフィル、ベンガラなど）などが挙げられる。

甘味剤の好適な例としては、サッカリンナトリウム、グリチルリチン二カリウム、アスパルテーム、ステビアなどが挙げられる。

#### 【0039】

前記医薬組成物の剤形としては、例えば錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、

マイクロカプセルを含む)、顆粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などの経口剤; および注射剤(例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤など)、外用剤(例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤など)、坐剤(例、直腸坐剤、膣坐剤など)、ペレット、点滴剤、徐放性製剤(例、徐放性マイクロカプセルなど)等の非経口剤が挙げられ、これらはそれぞれ経口的あるいは非経口的に安全に投与できる。

医薬組成物は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。以下に、製剤の具体的な製造法について詳述する。医薬組成物中の本発明のスクリーニング方法により得られる化合物の含量は、剤形、該化合物の投与量などにより異なるが、例えば約0.1ないし100重量%である。

#### 【0040】

例えば、経口剤は、有効成分に、賦形剤(例、乳糖、白糖、デンプン、D-マンニトールなど)、崩壊剤(例、カルボキシメチルセルロースカルシウムなど)、結合剤(例、 $\alpha$ 化デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなど)または滑沢剤(例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000など)などを添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマスキング、腸溶性あるいは持続性を目的として、コーティング基剤を用いて自体公知の方法でコーティングすることにより製造される。

#### 【0041】

該コーティング基剤としては、例えば糖衣基剤、水溶性フィルムコーティング基剤、腸溶性フィルムコーティング基剤、徐放性フィルムコーティング基剤などが挙げられる。

糖衣基剤としては、白糖が用いられ、さらに、タルク、沈降炭酸カルシウム、ゼラチン、アラビアゴム、プルラン、カルナバロウなどから選ばれる1種または2種以上を併用してもよい。

水溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メ

チルヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース系高分子；ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、アミノアルキルメタアクリレートコポリマーE〔オイドラギットE（商品名）、ロームファルマ社〕、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子；プルランなどの多糖類などが挙げられる。

腸溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース フタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロース アセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、酢酸フタル酸セルロースなどのセルロース系高分子；メタアクリル酸コポリマーL〔オイドラギットL（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマーLD〔オイドラギットLD-30D55（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマーS〔オイドラギットS（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子；セラックなどの天然物などが挙げられる。

徐放性フィルムコーティング基剤としては、例えばエチルセルロースなどのセルロース系高分子；アミノアルキルメタアクリレートコポリマーRS〔オイドラギットRS（商品名）、ロームファルマ社〕、アクリル酸エチル・メタアクリル酸メチル共重合体懸濁液〔オイドラギットNE（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子などが挙げられる。

上記したコーティング基剤は、その2種以上を適宜の割合で混合して用いてもよい。また、コーティングの際に、例えば酸化チタン、三二酸化鉄等のような遮光剤を用いてもよい。

#### 【0042】

注射剤は、有効成分を分散剤（例、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60など、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノールなど）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖など）などと共に水性溶剤（例、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）あるいは油性溶剤（例、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油などの植物油、プロピレングリコール等）などに溶解、懸濁あるいは乳化することにより製造

される。この際、所望により溶解補助剤（例、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、安定剤（例、ヒト血清アルブミン等）、無痛化剤（例、ベンジルアルコール等）等の添加物を用いてもよい。注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

#### 【0043】

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分である本発明のスクリーニング方法により得られる化合物として、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

#### 【0044】

本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として用いることもできる。

該予防・治療薬は、本発明のタンパク質に対する抗体そのものであってもよいが、該抗体を薬理学的に許容し得る担体とともに混合して得られる医薬組成物であることが好ましい。ここで、薬理学的に許容される担体としては、前記した「本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質」の場合と同様のものが挙げられる。

該医薬組成物は、前記した「本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質」の場合と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投

与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分である本発明のタンパク質に対する抗体として、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

#### 【0045】

本発明は、さらに本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（以下、本発明のポリヌクレオチドと略記することがある）を用いることを特徴とする、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法に関する。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられ、これらは二本鎖または一本鎖のいずれであってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。なお、本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前記したものが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合とで、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの量を比較すること；などによって行われる。

ここで、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞、該細胞の培養方法、および試験化合物としては、前記した本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法と同様のものが挙げられる。

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、公知の方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法またはそれに準じる方法



にしたがって定量することができる。例えば、ポリヌクレオチドが mRNA である場合、mRNA は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：3 または配列番号：4、あるいはそれらの一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション；プライマーとして配列番号：3 または配列番号：4、あるいはそれらの一部を含有する核酸を用いる PCR 法またはそれに準じる方法；などにしたがって定量することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（好ましくは mRNA）の量を約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上増大させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現を促進する化合物として；本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（好ましくは mRNA）の量を約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上減少させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物として選択することができる。

#### 【0046】

本発明のポリヌクレオチドを用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などのいずれであってもよい。これらは塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられる。

該スクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、必要により薬理学的に許容し得る担体とともに混合して医薬組成物とした後に、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として用いることができる。

ここで、薬理学的に許容される担体としては、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様のものが挙げられる。

該医薬組成物は、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様にして製

造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重 60 kg）においては、一日あたり、有効成分である本発明のスクリーニング方法により得られる化合物として、約 0.1 ないし 100 mg、好ましくは約 1.0 ないし 50 mg、より好ましくは約 1.0 ないし 20 mg である。

#### 【0047】

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質は、該タンパク質をコードする DNA のプロモーター活性を検出することによってスクリーニングすることもできる。

本発明のタンパク質をコードする DNA がレポーター遺伝子で置換された細胞あるいは非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のタンパク質をコードする DNA のプロモーターの支配下に存在するので、試験化合物の処理あるいは投与後に、レポーター遺伝子がコードする物質の発現を確認することにより、該プロモーターの活性を検出することができる。

また、本発明のタンパク質をコードする DNA の転写調節領域とレポーター遺伝子が連結されてできたベクターを有する細胞および非ヒト哺乳動物においても該プロモーターの活性を検出できる。

ここで、レポーター遺伝子としては、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。

例えば、本発明のタンパク質をコードする DNA 領域の一部を大腸菌由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに  $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。したがって、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル

— $\beta$ —ガラクトピラノシド (X-gal) のような $\beta$ —ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いる染色により、簡便に本発明のタンパク質の発現状態を確認することができる。具体的には、細胞あるいは組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または 37℃ 付近で、約 30 分ないし 1 時間反応させた後、組織標本を 1 mM EDTA / PBS 溶液で洗浄することによって、 $\beta$ —ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察することにより、細胞あるいは組織における本発明のタンパク質の発現状態を確認することができる。また、常法に従い、lacZ をコードする mRNA を検出してもよい。

本発明のタンパク質をコードする DNA に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物は、該タンパク質の発現、および該タンパク質の活性を調節するため、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として有用である。

#### 【0048】

本発明のタンパク質は、例えば腎疾患（例、糖尿病性腎症）などで発現が増加するため、腎疾患における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。よって、本発明のタンパク質に対する抗体、本発明のタンパク質をコードする DNA のアンチセンスヌクレオチドは、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物と同様に、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として有用である。

ここで、アンチセンスヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードする DNA の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該 DNA の発現抑制作用を有するものであればよいが、アンチセンス DNA が好ましい。

本発明のタンパク質をコードする DNA の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列としては、例えば、該 DNA の塩基配列に相補的な塩基配列（すなわち、本発明のタンパク質をコードする DNA の相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のタンパク質をコードする DNA の相補鎖の全塩基配列うち、該タンパク

質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが好ましい。

具体的には、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド；好ましくは、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド；さらに好ましくは、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド；などが挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドの構成塩基は、通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度である。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明のタンパク質をコードするDNAのアンチセンスヌクレオチドは、低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAの機能（例、チロキシン脱5'-ヨード化酵素活性）を抑制することができるので、例えば、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として使用することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予

防・治療物質の場合と同様にして、製剤化し、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。また、アンチセンスヌクレオチドは、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後に投与することもできる。

アンチセンスヌクレオチドは、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与してもよく、エアロゾル化後、吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

該アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

さらに、本発明のタンパク質をコードするDNAのアンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における該DNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAの機能を抑制することができるので、例えば、腎疾患の予防・治療剤などとして使用することができる。

ここで、二重鎖RNAは、公知の方法、例えばNature, 411巻, 494頁, 2001年に記載の方法に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法、例えばTRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年に記載の方法に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって、所望のリボザイムを製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知の

リボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として使用する場合、前記したアンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

【0049】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のタンパク質をコードするDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多または減少が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、腎疾患などの本発明のタンパク質が関連する疾患に罹患している可能性が高いと診断することができる。

【0050】

本発明は、さらに、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬に関する。ここで、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質が結合する

DNAに対するデコイヌクレオチドである。

該ポリヌクレオチドは、自体公知の方法にしたがって製造することができる。

該ポリヌクレオチドは、低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAの機能（例、チロキシン脱5'-ヨード化酵素活性）を抑制することができるので、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬として使用することができる。配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質を用いるスクリーニング方法により得られる本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様にして、製剤化し、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

また、該ポリヌクレオチドは、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後に投与することもできる。

該ポリヌクレオチドは、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与してもよく、エアロゾル化後、吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、腎疾患に罹患している成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分である配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有するポリヌクレオチドとして、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

#### 【0051】

本発明は、さらに、Egr-1抑制薬を含有してなる糖尿病性腎症の予防・治療薬に関する。

Egr-1抑制薬としては、生体内において、Egr-1の産生もしくは発現；またはEgr-1の活性を抑制しうる物質であれば、特に限定されず、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物

抽出液、動物組織抽出液、血漿などのいずれであってもよい。これらは塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが挙げられる。

E g r -1抑制薬は、好ましくは、腎臓において、E g r -1の産生もしくは発現；またはE g r -1の活性を抑制する物質、すなわち、腎E g r -1抑制薬である。

E g r -1抑制薬は、生体内において、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、血栓関連遺伝子などの因子の産生もしくは発現；またはこれらの因子の活性を抑制する物質であってもよい。

ここで、線維化関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子および血栓関連遺伝子としては、前記「実質的に同質の活性」として例示したものが挙げられる。

糖尿病性腎症の予防・治療薬は、E g r -1抑制薬を用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防・治療物質の場合と同様にして製剤化することができる。

本発明の糖尿病性腎症の予防・治療薬は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

本発明の糖尿病性腎症の予防・治療薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、成人患者（体重60kg）においては、一日あたり、有効成分であるE g r -1抑制薬として、約0.1ないし100mg、好ましくは約1.0ないし50mg、より好ましくは約1.0ないし20mgである。

#### 【0052】

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸



cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン

T y r           : チロシン  
 T r p           : トリプトファン  
 P r o           : プロリン  
 A s n           : アスパラギン  
 G l n           : グルタミン  
 p G l u        : ピログルタミン酸  
 S e c           : セレノシステイン (selenocysteine)

【0053】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

E g r -1のアミノ酸配列の部分配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒト E g r -1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するヒト E g r -1をコードする D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するヒト E g r -1をコードする D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

E g r -1のデオキシヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

E g r -1のデオキシヌクレオチドの塩基配列を示す。

【0054】

【発明の実施の形態】

以下において、実験例により本発明をより具体的に示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

実験例 1

Wistar fattyラットの腎臓におけるearly growth response-1(Egr-1)mRNA発現の増加

13、22及び40週齢の、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)を呈し糖尿病性腎症(DN)を自然発症する雄性Wistar fattyラット(武田ラビックス)と、その正常対照ラットである同週齢の雄性Wistar leanラット(武田ラビックス)を用いて、24時間蓄尿及び尾静脈採血を行い、尿中アルブミン排泄量、血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン濃度を測定した。尿中アルブミン排泄量はA/G Bテスト、ワコー(和光純薬)を用いて測定し、血漿中グルコース濃度は、シンクロンCX5デルタ(Beckman Coulter)を用いて測定した。インスリン濃度は、RIA法(塩野義製薬)により測定した。

各5匹のラットより腎臓を採取して-80℃で保存後、腎臓を破砕してtotal RNAを抽出した。既報のmRNA配列をもとにプライマー及び蛍光プローブを作製し、ABI PRISM 7700(Applied Biosystems)を用いてリアルタイム定量RT-PCR法により各種mRNA発現量を測定した。

結果を[表1]及び[表2]に示す。Wistar fattyラットは、13週齢よりNIDDMを呈し、22週齢よりDNを発症して尿中アルブミン排泄量が増加した。22週齢以降にEgr-1 mRNA発現量の増加が認められ、40週齢でTransforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)及びfibronectin mRNA発現量の増加が認められた。

[表1] 尿中アルブミン排泄量、血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン濃度

	Wistar lean ラット			Wistar fatty ラット		
	13週齢	22週齢	40週齢	13週齢	22週齢	40週齢
尿中アルブミン 排泄量 (mg/day)	5.1	4.0	10.4	6.7	55.7	182.0
血漿中グルコース 濃度(mg/dl)	138.9	137.1	134.3	319.2	402.9	319.4
血漿中インスリン 濃度( $\mu$ Units/ml)	123.0	125.6	158.7	1091.9	1019.2	1674.4

(n=5, Mean)

[表2] Wistar fattyラットの腎臓における Egr-1、TGF- $\beta$  1及び fibronectinの mRNA発現量

(各週齢のWistar lean ラットの腎臓における発現量を1とした時の相対値)

週齢	13週齢	22週齢	40週齢
Egr-1	1.1	2.2	2.4
TGF- $\beta$ 1	1.1	1.0	1.7
Fibronectin	1.2	1.0	2.1

(n=5, Mean)

【0055】

#### 実験例 2

Zucker fattyラットの腎臓におけるearly growth response-1 (Egr-1) mRNA発現の変化

高インスリン血症を呈し、腎障害を自然発症する雄性Zucker fattyラット (ZFラット、18週齢、日本チャールズリバー) に、0.5%メチルセルロース100cPに懸濁したカンデサルタン シレキセチル (angiotensin II type1受容体拮抗薬) を9週間、一日一回連日経口投与した。対照群及び正常対照群である同週齢の雄性Zucker leanラット (ZLラット、日本チャールズリバー) には0.5%メチルセルロース100cP (Vehicle) を一日一回連日経口投与した。投与8週後に24時間蓄尿を行い、A/G Bテストワコー (和光純薬) を用いて尿中アルブミン排泄量を測定した。投与9週後に腎臓を採取し、-80℃で保存後、腎臓を破砕してtotal RNAを抽出した。既報のmRNA配列をもとにプライマー及び蛍光プローブを作製し、ABI PRISM7700 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量RT-PCR法により各種mRNA発現量を測定した。

結果を[表3] 及び[表4] に示す。尿中アルブミン排泄量が増加しているZucker fattyラットの腎臓においてはEgr-1 mRNA発現量が増加し、Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1)、platelet-derived growth factor-B (PDGF-B)、fibronectin及び $\alpha$  1(I) collagenの各mRNA発現の増加も認められた。さらに、カ

ンデサルタン シレキセチル投与により尿中アルブミン排泄量の増加が抑制された場合には、上記のいずれのmRNA発現量増加も抑制された。

〔表3〕 尿中アルブミン排泄量、血中グルコース濃度及び血中インスリン濃度

	ZLラット Vehicle	ZFラット Vehicle	ZFラット カンデサルタン シレキセチル
尿中アルブミン 排泄量 (mg/day)	48.5	401.5	61.7

(n=8-9, Mean)

〔表4〕 Zucker fattyラットの腎臓におけるEgr-1、TGF- $\beta$  1、PDGF-B、fibronectin及び $\alpha$  1(I) collagenのmRNA発現量 (ZLラットの腎臓における発現量を1とした時の相対値)

	ZFラット Vehicle	ZFラット カンデサルタン
Egr-1	2.9	1.3
TGF- $\beta$ 1	2.1	1.2
PDGF-B	1.5	1.0
Fibronectin	2.1	1.1
$\alpha$ 1(I) collagen	2.3	1.6

(n=8-9, Mean)

【0056】

### 実験例 3

ラット腎系球体メサンギウム細胞におけるearly growth response-1(Egr-1) mRNA発現の増加

4週齢の雄性Sprague-Dawleyラット (SDラット、日本クレア) より単離培養した腎系球体メサンギウム細胞(passage 7)を、20% ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEM培地で4日間培養後、0.2% ウシ血清アルブミンを含むDMEMにて3日間培養した。

培養後の細胞に、FCS(20 %)またはangiotensin II(AII)( $10^{-6}$  M)を添加し、37

℃で30分間反応させた。AII type 1 受容体拮抗薬 カンデサルタンは、FCSまたはAII刺激5分前に最終濃度が $10^{-5}$  Mになるよう培地に添加した。FCSまたはAII刺激30分後、totalRNAを抽出した。既報のmRNA配列をもとにプライマーと蛍光プローブを作製し、ABI PRISM 7700(Applied Biosystems)を用いてリアルタイム定量RT-PCR法によりEgr-1 mRNA発現量を測定した。

結果を〔表5〕及び〔表6〕に示す。Egr-1 mRNA発現量はFCS刺激30分後に著明に増加し、カンデサルタンにより部分的に抑制された。また、AII刺激30分後にはEgr-1 mRNA発現量の軽度の増加が認められ、カンデサルタンにより大部分が抑制された。

〔表5〕 FCS刺激によるEgr-1 mRNA発現の増加及びカンデサルタンの抑制作用（刺激前の発現量を1とした時の相対値）

Egr-1mRNA発現量	
刺激前	1.0
FCS刺激30分後	26.6
+ Vehicle	
FCS刺激30分後	18.4
+ カンデサルタン	
(n=3, Mean)	

〔表6〕 AII刺激によるEgr-1 mRNA発現の増加及びカンデサルタンの抑制作用（刺激前の発現量を1とした時の相対値）

Egr-1mRNA発現量	
刺激前	1.0
AII刺激30分後	2.8
+ Vehicle	
AII刺激30分後	1.3
+ カンデサルタン	
(n=3, Mean)	

【0057】

## 実験例4

自然発症高コレステロール血症ラットの腎臓におけるearly growth response-1 (Egr-1) mRNA発現の増加

腎障害を自然発症する雄性の自然発症高コレステロール血症ラット (SHCラット、11週齢、武田ラビックス) 及び正常対照群である同週齢の雄性Sprague-Dawleyラット (SDラット、日本クレア) を用いて、24時間蓄尿及び尾静脈採血を行い、尿中アルブミン排泄量及び血漿中総コレステロール濃度を測定した。尿中アルブミン排泄量はA/G Bテストワコー (和光純薬) を用いて測定し、血漿中総コレステロール濃度はシンクロンCX5デルタ (Beckman Coulter) を用いて測定した。

12週齢の時点でラットから腎臓を採取し、-80℃で保存後、腎臓を破砕してtotal RNAを抽出した。既報のmRNA配列をもとにプライマー及び蛍光プローブを作製し、ABI PRISM7700 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム定量RT-PCR法によりEgr-1 mRNA発現量を測定した。

12週齢のSHCラット及びSDラットの尿中アルブミン排泄量はそれぞれ179.2及び9.2 (mg/day, Mean (n=5)) であり、血漿中コレステロール濃度はそれぞれ92.4及び43.5 (mg/dl, Mean (n=5)) であり、いずれのパラメータもSHCラットにおいて高値であった。この時のSHCラットの腎臓におけるEgr-1 mRNA発現量は、SDラットの腎臓における発現量と比較して、3.8倍 (Mean (n=5)) に増加していた。

【0058】

## 【発明の効果】

本発明のスクリーニング法によれば、優れた効果を有し、かつ、副作用のない腎疾患などの予防・治療薬をスクリーニングすることができる。

【0059】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Screening method

&lt;130&gt; B01463

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg Met Arg Lys Tyr Pro Asn

5

10

15

Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg Pro Tyr Ala Cys Pro Val

20

25

30

Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His

35

40

45

Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met

50

55

60

Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr Thr His Ile Arg Thr His

65

70

75

80

Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala

85

90

95

Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys

100

105

110

Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala Ser

115

120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 544

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

Met Ala Ala Ala Lys Ala Glu Met Gln Leu Met Ser Pro Leu Gln Ile

5

10

15



Ser Asp Pro Phe Gly Ser Phe Pro His Ser Pro Thr Met Asp Asn Tyr  
 20 25 30  
 Pro Lys Leu Glu Glu Met Met Leu Leu Ser Asn Gly Ala Pro Gln Phe  
 35 40 45  
 Leu Gly Ala Ala Gly Ala Pro Glu Gly Ser Gly Ser Asn Ser Ser Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Ser Ser Thr Phe Asn Pro Gln Ala Asp Thr Gly Glu Gln Pro  
 85 90 95  
 Tyr Glu His Leu Thr Ala Glu Ser Phe Pro Asp Ile Ser Leu Asn Asn  
 100 105 110  
 Glu Lys Val Leu Val Glu Thr Ser Tyr Pro Ser Gln Thr Thr Arg Leu  
 115 120 125  
 Pro Pro Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Phe Ser Leu Glu Pro Ala Pro Asn  
 130 135 140  
 Ser Gly Asn Thr Leu Trp Pro Glu Pro Leu Phe Ser Leu Val Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Val Ser Met Thr Asn Pro Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ala Pro Ser  
 165 170 175  
 Pro Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ser Gln Ser Pro Pro Leu Ser Cys  
 180 185 190  
 Ala Val Pro Ser Asn Asp Ser Ser Pro Ile Tyr Ser Ala Ala Pro Thr  
 195 200 205  
 Phe Pro Thr Pro Asn Thr Asp Ile Phe Pro Glu Pro Gln Ser Gln Ala  
 210 215 220  
 Phe Pro Gly Ser Ala Gly Thr Ala Leu Gln Tyr Pro Pro Pro Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Ala Lys Gly Gly Phe Gln Val Pro Met Ile Pro Asp Tyr Leu

245	250	255
Phe Pro Gln Gln Gln Gly Asp Leu Gly Leu Gly Thr Pro Asp Gln Lys		
260	265	270
Pro Phe Gln Gly Leu Glu Ser Arg Thr Gln Gln Pro Ser Leu Thr Pro		
275	280	285
Leu Ser Thr Ile Lys Ala Phe Ala Thr Gln Ser Gly Ser Gln Asp Leu		
290	295	300
Lys Ala Leu Asn Thr Ser Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg		
305	310	315
Met Arg Lys Tyr Pro Asn Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg		
325	330	335
Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser		
340	345	350
Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe		
355	360	365
Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr		
370	375	380
Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile		
390	395	400
Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys		
405	410	415
Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala		
420	425	430
Ser Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Tyr Pro Ser Pro Val Ala Thr		
435	440	445
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Pro Ala Thr Thr		
450	455	460
Ser Tyr Pro Ser Pro Val Pro Thr Ser Phe Ser Ser Pro Gly Ser Ser		
470	475	480

Thr Tyr Pro Ser Pro Val His Ser Gly Phe Pro Ser Pro Ser Val Ala

485

490

495

Thr Thr Tyr Ser Ser Val Pro Pro Ala Phe Pro Ala Gln Val Ser Ser

500

505

510

Phe Pro Ser Ser Ala Val Thr Asn Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly Leu

515

520

525

Ser Asp Met Thr Ala Thr Phe Ser Pro Arg Thr Ile Glu Ile Cys

530

535

540

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1632

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

```

atggccgcgg ccaaggccga gatgcagctg atgtccccgc tgcagatctc tgaccgcgttc 60
ggatcctttc ctactcgcc caccatggac aactacccta agctggagga gatgatgctg 120
ctgagcaacg gggctcccca gttcctcggc gccgccgggg cccagagggg cagcggcagc 180
aacagcagca gcagcagcag cgggggcggt ggaggcggcg ggggcggcag caacagcagc 240
agcagcagca gcaccttcaa cctcaggcg gacacgggcg agcagcccta cgagcacctg 300
accgcagagt ctttctctga catctctctg aacaacgaga aggtgctggt ggagaccagt 360
taccacagcc aaaccactcg actgcccccc atcacctata ctggccgctt ttccctggag 420
cctgcaccca acagtggcaa caccttgttg cccgagcccc tcttcagctt ggtcagtggc 480
ctagttagca tgaccaaccc accggcctcc tcgtcctcag caccatctcc agcggcctcc 540
tcgcctccg cctccagag cccaccctg agctgcgcag tgccatccaa cgacagcagt 600
cccatttact cagcggcacc caccttcccc acgccgaaca ctgacatttt ccttagacca 660
caaagccagg ctttcccggg ctccggcagg acagcgtccc agtaccgcc tcctgcctac 720
cctgccgcca aggggtggctt ccagggtccc atgatccccg actacctgtt tccacagcag 780
cagggggatc tgggcctggg caccacagac cagaagccct tccagggcct ggagagccgc 840
accagcagc cttcgctaac ccctctgtct actattaagg cctttgccac tcagtcgggc 900
tcccaggacc tgaaggccct caataccagc taccagtccc agctcatcaa accagccgc 960

```

atgcgcaagt atcccaaccg gccagcaag acgccccccc acgaacgccc ttacgcttgc 1020  
 ccagtggagt cctgtgatcg ccgcttctcc cgctccgacg agctcaccgc ccacatccgc 1080  
 atccacacag gccagaagcc cticcagtgc cgcattctga tgcgcaactt cagccgcagc 1140  
 gaccacctca ccaccacat ccgcacccac acaggcgaaa agcccttcgc ctgcgacatc 1200  
 tgtggaagaa agtttgccag gagcgatgaa cgcaagaggc ataccaagat ccacttgagg 1260  
 cagaaggaca agaaagcaga caaaagtgtt gtggcctctt cggccacctc ctctctctct 1320  
 tcctaccgt ccccggttgc tacctcttac ccgtccccgg ttactacctc ttatccatcc 1380  
 ccggccacca cctcatacc atcccctgtg ccacctcct tctcctctcc cggctcctcg 1440  
 acctaccat cccctgtgca cagtggcttc ccctccccgt cggtgccac cacgtactcc 1500  
 tctgttcccc ctgctttccc ggcccaggtc agcagcttcc ctccctcagc tgtcaccaac 1560  
 tccttcagcg cctccacagg gctttcggac atgacagcaa ctttttctcc caggacaatt 1620  
 gaaatttgct aa 1632

<210> 4

<211> 1632

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

atggccgcgg ccaaggccga gatgcagctg atgtccccgc tgcagatctc tgacccgttc 60  
 ggatcctttc ctactcgcc caccatggac aactacccta agctggagga gatgatgctg 120  
 ctgagcaacg gggctcccca gttcctcggc gccgccgggg ccccagaggg cagcggcagc 180  
 aacagcagca gcagcagcag cgggggcggg ggaggcggcg ggggcggcag caacagcagc 240  
 agcagcagca gcaccttcaa ccctcaggcg gacacgggcg agcagcccta cgagcacctg 300  
 accgcagagt cttttcctga catctctctg aacaacgaga aggtgctggt ggagaccagt 360  
 taccacagcc aaaccactcg actgcccc atcacctata ctggccgctt ttccctggag 420  
 cctgcaccca acagtggcaa caccttgtgg cccgagcccc tcttcagctt ggtcagtggc 480  
 ctagtgagca tgaccaaccc accggcctcc tcgtcctcag caccatctcc agcggcctcc 540  
 tccgcctccg cctcccagag cccaccctg agctgcgcag tgccatccaa cgacagcagt 600  
 cccatttact cagcggcacc caccttcccc acgccgaaca ctgacatttt ccctgagcca 660  
 caaagccagg ccttcccggg ctccggcagg acagcgctcc agtaccgcc tcctgcctac 720

cctgccgcca aggggtggctt ccaggttccc atgatccccg actacctggt tccacagcag	780
cagggggatc tgggcctggg caccacagac cagaagccct tccagggcct ggagagccgc	840
accagcagc cttcgctaac ccctctgtct actattaagg cctttgccac tcagtcgggc	900
tcccaggacc tgaaggccct caataccagc taccagtccc agctcatcaa accagccgc	960
atgcgcaagt accccaaccg gccagcaag acgcccccc acgaacgccc ttacgcttgc	1020
ccagtggagt cctgtgatcg ccgtttctcc cgctccgacg agctcaccgc ccacatccgc	1080
atccacacag gccagaagcc cttccagtgc cgcattctga tgcgcaactt cagccgcagc	1140
gaccacctca ccaccacat ccgcaccac acaggcgaaa agcccttcgc ctgcgacatc	1200
tgtggaagaa agtttgccag gagcgatgaa cgcaaggaggc ataccaagat ccacttgcgg	1260
cagaaggaca agaaagcaga caaaagtgtt gtggcctctt cggccacctc ctctctctct	1320
tcctaccgt ccccggttgc tacctcttac ccgtccccgg ttactacctc ttatccatcc	1380
ccggccacca cctcataccc atcccctgtg cccacctct tctctctcc cggtcctcg	1440
acctaccat cccctgtgca cagtggcttc cctccccgt cgggtggccac cacgtactcc	1500
tctgttcccc ctgcittccc ggcccaggtc agcagcttcc cttcctcagc tgtcaccaac	1560
tccttcagcg cctccacagg gctttcggac atgacagcaa ctttttctcc caggacaatt	1620
gaaatttgct aa	1632

<210> 5

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

gcgtgggcg

9

<210> 6

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

gcgggggcg

9

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腎疾患などの予防・治療薬をスクリーニングするための方法を提供する

。 【解決手段】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩を用いることを特徴とする、該タンパク質またはその塩が関連する疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法

。 【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日

1992年 1月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名

武田薬品工業株式会社